

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Attorney Docket No. 017753-160 Patent 84w

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Gilles Cauet et al.

Group Art Unit: 1652

Application No.: 10/089,803

Examiner: Delia M. Ramirez

Filing Date: July 22, 2002

Confirmation No.: 2729

Title: METHOD FOR PREPARING STEROIDS MODIFIED BY YEAST FERMENTATION

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: France

Patent Application No(s): 9912410

Filed: October 5, 1999

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

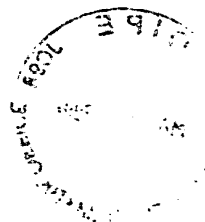
P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

Date: May 17, 2004

By 

Teresa Stanek Rea

Registration No. 30,427



THIS PAGE BLANK (USPTO)



②

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **23 AVR. 2004**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04. Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **5 OCT 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9912410**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **05 OCT. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE
CABINET REGIMBEAU
Conseils en Propriété Industrielle
20 Rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
237850 D18217 BF **01 45 00 92 02**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen
☐ demande initiale
☐ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de production de stéroïdes modifiés par fermentation de levures.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination
TRANSGENE S.A.

Forme juridique
SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92-1001

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1...2
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif) 237850 D18217 BF			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 12410	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de production de stéroïdes modifiés par fermentation de levures.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
TRANSGENE S.A. : 11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CAUET Gilles	
Prénoms			
Adresse	Rue	8 rue du Général Leclerc - 67370 GRIESHEIM SUR SOUFFEL - FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DEGRYSE Eric	
Prénoms			
Adresse	Rue	10 Allée de la toison d'or - 94000 CRETEIL - FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VICO Pedro	
Prénoms			
Adresse	Rue	Résidence le colvert - 103 route de Schirmeck - 67200 STRASBOURG - FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1...2
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif) <u>237850 D18217 BF</u>			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		<u>99 12410</u>	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de production de stéroïdes modifiés par fermentation de levures.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
TRANSGENE S.A. : 11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		<u>LATHE Richard</u>	
Prénoms			
Adresse	Rue	<u>King's Buildings - West Mains Road - Edinburgh EH9 3JQ - GRANDE-BRETAGNE</u>	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			

La présente invention concerne un nouveau procédé de production de stéroïdes hydroxylés ou/et acétylés par fermentation de levures.

5 Les stéroïdes, notamment les stéroïdes dérivés du cholestérol, sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels on peut citer la régulation des taux de glucides et cholestérol dans la circulation sanguine, le maintien et développement de la masse musculaire, le développement du système nerveux central.

10 Parmi les inconvénients observés en cas de dérèglement des taux de stéroïdes circulants, on peut citer le déclenchement éventuel de maladies auto-immunes, telles le lupus, de certains cancers, par exemple le cancer du sein, de maladies cardiovasculaires, par exemple l'athérosclérose. Des problèmes de régulation de stéroïdes sont également soupçonnés dans le cas du déclenchement de certaines
15 maladies neurologiques tels les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

Les études réalisées, notamment par le Professeur Baulieu, sur la déhydroépiandrostérone ou DHEA ont montré l'importance des stéroïdes, notamment des neurostéroïdes, dans le développement du système nerveux central mais également l'impact possible de ce type de stéroïdes dans tous les processus connexes, y compris
20 le phénomène de vieillissement (Baulieu et Robel, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 4089-4091).

Il est donc particulièrement intéressant de pouvoir disposer de nouveaux dérivés stéroïdiques, notamment de la famille des neurostéroïdes, qui sont impliqués dans un très grand nombre de processus physiologiques.

25 C'est précisément l'un des objets de la présente invention, à savoir la mise au point d'un procédé permettant l'accès à de nouveaux dérivés stéroïdiques, notamment des neurostéroïdes, et ce par des méthodes de fermentation qui autorisent des spécificités élevées, de même que des rendements de production importants.

30 Les procédés selon la présente invention peuvent d'ailleurs être utilisés afin d'obtenir des stéroïdes dont la structure est également connue mais qui, jusqu'ici, étaient difficilement accessibles par des procédés commercialement acceptables.

La présente invention repose sur la mise en évidence du fait que les levures sont capables de convertir biologiquement, ou bioconvertir, des stéroïdes précurseurs en produisant des stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés divers, lesquels peuvent bien entendu, si cela est nécessaire, être ensuite modifiés sur de telles fonctions particulièrement réactives.

C'est pourquoi la présente invention concerne notamment un procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant les étapes selon lesquelles :

- on cultive des levures sur un **milieu** comprenant au moins un **précurseur** de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis
- on **isole** les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion,

ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures **transformées** de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*.

La levure possède naturellement une activité enzymatique d'acétylation codée par le gène *atf2*, et une activité enzymatique de déshydrogénation codée par le gène *yil124w*.

L'enzyme codée par le gène *atf2* (dont la séquence et l'activité sont décrites dans Cauet et al., 1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324 et dans la demande de brevet français FR2774393 ou à l'adresse <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) est l'acétyl coenzyme-A-pregnénolone-acétyl transférase, ci-après dénommée « APAT ». Cette enzyme permet l'estérification, et plus particulièrement l'acétylation, d'un précurseur stéroïdien tel que par exemple un Δ^5 - ou Δ^4 -3 β -hydroxystéroïde, tel que la pregnénolone, la 17-hydroxy pregnénolone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), ou la 4-pregnene-3 β ol-20-one, par exemple. De manière préférée, cette estérification est réalisée au niveau de la fonction OH en position 3 d'undit précurseur. L'expression de cette activité dans les levures permet par conséquent l'obtention de dérivés de précurseurs stéroïdiens acétylés, en tout ou en partie. De même il est possible de protéger chimiquement tout ou partie des fonctions OH du précurseur incorporé au milieu de culture de manière à ce que la réaction d'acétylation ne puisse pas se produire sur tout ou partie desdites fonctions. De telles méthodes de protection sont bien connues et consistent par exemple en l'addition de silane, en la modification en fonction ester,... Toutefois, selon un mode de réalisation

particulier de la présente invention décrit ci-après, il est également possible d'utiliser des souches de levure dépourvue de l'activité enzymatique APAT, telles que notamment celles décrites dans Cauet et al. (1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324) ou dans la demande de brevet français FR2774393, dont les contenus sont incorporés à titre de références dans la présente demande.

Le gène *yil124w* a été décrit lors du projet de séquençage du génome de la levure, toutefois sa fonction n'avait alors pas été déterminée. Il est localisé sur le chromosome IX, aux coordonnées 126204 à 127097. Sa séquence est aisément accessible à l'homme de l'art dans la base de données du génome de *Saccharomyces* située, par exemple, à l'adresse <http://genome-www.stanford.edu/>. Dans le cadre des travaux de la présente invention, il a été montré que la protéine codée par le gène *yil124w* possède une activité déshydrogénase comparable à l'activité de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase précédemment décrite chez les mammifères (17BDH ; Wu et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 12964-12969). Cette activité dirige plus spécifiquement la réduction en alcool de la fonction cétone située, naturellement ou après modification chimique, en position 17 de certains précurseurs stéroïdiens tels que la DHEA, par exemple. Plus particulièrement, dans le cas du substrat DHEA, l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène *yil124w* conduit à la réduction de la fonction cétone de ce stéroïde et à la formation d'un 3, 17-diol, auquel on référera ci-après comme « Diol ». En outre, lorsque le cas l'impose, la séquence du gène *yil124w* étant connue, il est aisé à l'homme de l'art, familier des techniques de mutagenèse dans la levure, de produire une souche de levure dans lesquelles le gène *yil124w* est inactivé. Par exemple, conformément aux exemples qui suivent, il est possible d'obtenir des souches de levure pour lesquelles la séquence codante du gène *yil124w* est interrompue (technique Knock-out) et l'activité enzymatique supprimée.

Le gène *Cyp7b* est connu, il a déjà été décrit par Stapleton et al., (1995, J. Biol. Chem., 270, 29739-29745) ou Rose et al. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4925-4930). Sa séquence est notamment décrite dans la demande de brevet WO9612820 et est accessible auprès de Institute for Fermentation Osaka (IFO) sous le code d'accès IFO 2031. Les contenus de ces documents sont incorporés à la présente demande à titre de références. Toutefois, rien ne laissait supposer que ce gène de

mammifère pouvait être exprimé, et plus particulièrement exprimé sous sa forme active, par une levure. En outre, rien ne permettait d'envisager qu'une telle levure serait capable d'utiliser un stéroïde comme substrat. En effet, le gène *Cyp7b* est un gène isolé chez les mammifères, notamment le rat, la souris et l'homme, chez lesquels l'enzyme codée par ce gène appartient à la famille des enzymes communément appelées « cytochromes P450 », dont la forme active renferme de l'hème (Poulos, 1988, Pharm. Res., 5, 67-75) et qui sont impliquées dans les voies métaboliques des stéroïdes (voir Rose *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4925-4930). La protéine *Cyp7b* est une hydroxylase, et plus particulièrement une 7-hydroxylase permettant d'obtenir des stéroïdes 7-hydroxylés, et plus particulièrement des stéroïdes 7 α -hydroxylés. Néanmoins, il est possible d'envisager le cas particulier pour lequel le substrat stéroïdien est un équivalent des composés stéroïdiens connus, dans lequel par modification de la structure de l'un des cycles la « position naturellement 7 » soit transformée en un « équivalent position 6 ». Dans ce cas précis, la protéine *Cyp7b* permettrait d'obtenir des stéroïdes 6-hydroxylés.

Selon un cas préféré de l'invention, l'action sur le composé « Diol » décrit plus haut de l'enzyme *Cyp7b* exprimée dans les levures utilisées permet la formation d'un 3, 7, 17- triol, ci-après dénommé « Triol ». En outre, lorsque la fonction 3OH dudit diol ou dudit triol est acétylée, on parlera respectivement d'« acétyl-diol » ou d'« acétyl-triol ».

La nature des stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés produits selon le procédé de l'invention dépend par conséquent de la possibilité pour la levure d'exprimer ou non les fonctions d'acétylation codée par le gène *atf2*, et/ou de déshydrogénation, codée par le gène *yil124w*, en combinaison avec la possibilité pour ladite levure d'exprimer l'enzyme d'hydroxylation *Cyp7b*.

De préférence, les composés que l'on souhaitera produire selon la présente invention seront des composés hydroxylés, dans la mesure où, pour un grand nombre de stéroïdes, il a été montré que le dérivé hydroxylé était plus actif que le dérivé acétylé. Néanmoins, à cet égard, il convient de noter que la fonction acétyle est susceptible d'être progressivement hydrolysée *in vivo* et peut donc constituer une forme retard de la forme hydroxylée (c'est à dire que le composé tel qu'administré au patient n'est pas la forme active mais que cette forme active est obtenue *in vivo*, après métabolisation naturelle du composé acétylé). C'est pourquoi la présente invention

concerne tout aussi bien un procédé de production de stéroïdes comportant des fonctions OH libres, que protégées par un radical acétyle.

En tout état de cause, selon le mode de réalisation préféré pour lequel on cherche à produire des dérivés stéroïdiens hydroxylés, il est souhaitable que l'activité APAT de la levure mise en œuvre dans le procédé de l'invention soit faible ou nulle. Pour ce faire, il existe différentes possibilités.

Selon une première variante, il est possible d'utiliser des souches de levures dans lesquelles le gène *atf2* est naturellement absent ou, à tout le moins, est peu ou non exprimé. Ainsi, Nagasawa et al. (Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1852-1857, 1998) mentionnent qu'une souche IFO2031 (*Saccharomyces bayanus*) est exempte du gène *atf2*.

Selon une autre variante, il est possible d'utiliser des conditions de culture dans lesquelles la capacité des levures à acétyler le ou les précurseurs stéroïdiens présents dans le milieu de culture est fortement réduite, voire éliminée. En particulier, la demanderesse a mis en évidence le fait que les souches possédant l'activité *atf2*+ effectuent des réactions d'acétylation plus limitées en conditions oxydatives, notamment par croissance sur des sources de carbone non fermentescibles, telles que par exemple le glycérol ou l'acétate.

Selon une troisième variante, il est également possible d'utiliser des souches de levure présentant, naturellement ou après manipulation génétique, une activité désacétylase. Cette activité a été décrite comme agissant sur les esters d'alcools à chaîne courte (rEF). L'utilisation d'un tel système permettrait de désacétyler les produits obtenus par l'activité APAT.

Enfin, il est possible d'utiliser des souches *atf2*⁻, c'est-à-dire dans lesquelles le gène ne s'exprime pas ou dans lesquelles le produit de ce gène est inactif. Plus particulièrement, l'homme de l'art est capable, par des expériences de routine, de préparer des souches de levure dépourvues de l'activité enzymatique APAT, telles que notamment celles décrites dans Cauet et al. (1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324) ou dans la demande de brevet français FR2774393 dont les contenus sont incorporés à titre de références dans la présente demande.

De même, il peut être intéressant de n'induire l'activité du gène *atf2* qu'à un certain moment du procédé de l'invention, par exemple séquentiellement à l'expression du gène *Cyp7b*. Ainsi, certains promoteurs ont été décrits chez la levure,

qui ne sont actifs qu'en présence d'une stimulation extérieure (Guarente et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 7410-7414) ou lorsque les levures sont en phase stationnaire (Panaretou et al., 1992, Eur. J. Biochem., 206, 635-640). L'utilisation d'un gène *atf2* placé sous contrôle d'un tel promoteur permet par conséquent de contrôler l'activité
 5 APAT chez la levure renfermant un tel gène recombiné.

De la même façon, la présence chez la levure utilisée dans le procédé de l'invention d'une activité endogène similaire à l'activité 17BDH des mammifères (codée par le gène *yil124w*) mène à la formation de composés réduits qui peuvent apporter une valeur ajoutée par rapport au produit non modifié. Inversement, il peut
 10 également être souhaitable de disposer de souches de levure ou des conditions de culture pour lesquelles l'activité du gène *yil124w* est réduite ou supprimée. Ainsi, il est possible de faire appel à des conditions de culture en milieu oxydatif ou à l'utilisation de souches de levures dans lesquelles le gène *yil124w* a été inactivé.

Bien entendu, selon des cas préférés de l'invention pour lesquels il est
 15 intéressant d'obtenir des composés réduits, il est possible de disposer de souches de levure capables de surexprimer le gène *yil124w* ou d'exprimer l'activité 17BDH à un moment privilégié de la bioconversion, par exemple par l'utilisation de souches pour lesquelles le gène *yil124w* est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible tel que ceux décrits plus haut.

Il est bien entendu possible de modifier en outre la fonction acétyle
 20 obtenue après l'action de l'activité APAT lors du procédé de l'invention mettant en œuvre une souche de levure *atf2+*, par exemple en transformant ladite souche de levure afin qu'elle exprime en outre une activité enzymatique réagissant sur ce substrat. On peut ainsi obtenir des dérivés stéroïdiens méthylés, lorsque le gène en
 25 question code pour une enzyme à activité méthylase.

Parmi les substrats précurseurs de stéroïdes utilisables dans la présente invention, il faut citer les stéroïdes ou précurseurs de stéroïdes possédant une position 7- hydroxylable, c'est à dire accessible et susceptible d'être hydroxylée par une enzyme présentant une activité hydroxylase. Des exemples de telles positions
 30 hydroxylables consistent notamment en un carbone, un soufre, un azote.

Parmi les substrats précurseurs de stéroïdes utilisables dans la présente invention, il faut citer plus particulièrement les stéroïdes 3-hydroxylés et notamment les stéroïdes 3- β -hydroxylés, ou possédant une fonction 3-céto.

Plus particulièrement, sans que cette liste ne soit limitative, dans cette invention on considèrera un précurseur sélectionné parmi le groupe consistant en les stéroïdes à structure de type androstannique, androsténique, prégнанique, prégénique, cholannique, cholénique, cholestérique, ergotannique, ergosténique, testostéronique ou stigmamique, par exemple la DHEA, la testostérone, la prégénolone, la prégnanolone, le 25-hydroxy-cholestérol, le 5- α -androstane-3 β -17 β -diol, ou le 5- α -androstène-3 β -17 β -diol.

Bien entendu, ces composés peuvent également être obtenus sous forme acétylée. La fonction cétone 17 des précurseurs en possédant une peut aussi subir une réduction, comme cela a été décrit précédemment.

L'invention peut être mise en œuvre en utilisant des levures de différents genres qui peuvent être, sans que cette liste ne soit limitative, sélectionnés parmi *Candida*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*.

Une réalisation préférée de l'invention mettra en œuvre des levures du genre *Saccharomyces*, par exemple *S. cerevisiae*.

Les conditions dans lesquelles ces levures peuvent être cultivées sont connues de l'homme du métier, il suffit d'ajouter au milieu de culture un substrat précurseur des stéroïdes souhaités pour mettre en œuvre le procédé selon la présente invention.

Les exemples proposés ci-dessous montrent que certains milieux sont plus favorables que d'autres à la production de stéroïdes hydroxylés, il s'agit là d'un paramètre qui peut être aisément optimisé par l'homme du métier.

Parmi les milieux, il faut citer : YPD, YPG, YNBD et YNBG contenant notamment du glycérol et/ou du glucose (voir également Sherman, 1991, *Methods Enzymol.*, 194, 3-21). De même, il est possible d'adapter la composition du milieu en cours de procédé ou de sélectionner le milieu en fonction du promoteur sélectionné pour diriger l'expression du gène *Cyp7b* (par exemple, le milieu minimum YNBD sera choisi dans le cas du promoteur CYC1 et le milieu riche YPG sera sélectionné dans le cas du promoteur TEF1).

Les conditions additionnelles de culture sont les conditions habituelles mais peuvent être optimisées.

Les quantités de précurseur ajoutées au milieu de culture dans le cadre du procédé de l'invention seront choisies de manière à obtenir une concentration dans le milieu de bioconversion comprise entre 10 et 200 µg/ml, préférentiellement comprise entre 20 et 100 µg/ml.

5 Les levures utilisées dans le cadre de l'invention sont des souches transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*. Cela signifie que lesdites souches ont été préalablement modifiées de façon à introduire le gène *Cyp7b* dans les levures et permettre son expression. Pour ce qui concerne la transformation des levures afin d'exprimer le gène *Cyp7b*, il est possible d'introduire ce gène soit dans le génome
10 de la levure, soit de façon à ce qu'il ait une localisation extrachromosomale. A ces effets, on peut utiliser des systèmes de type plasmidique, circulaires ou linéaires. Parmi les plasmides comportant des origines de réplication de la levure, on peut citer les plasmides dérivés du plasmide 2µ de *Saccharomyces*, lequel comportera de préférence comme marqueur de sélection, soit un marqueur de sélection de résistance aux
15 antibiotiques, par exemple le gène G418R, soit au moins un marqueur d'auxotrophie tel que URA3, URA3d LEU2. De telles techniques de transformation sont bien décrites dans la littérature et ne présentent pas de difficulté particulière.

Pour ce qui concerne le gène *Cyp7b*, sa séquence nucléique (Institute for Fermentation Osaka (IFO), code d'accès IFO 2031 ou SEQ ID N01) peut être clonée
20 sous le contrôle d'un promoteur de levure tel que CYC1 (Degryse *et al.* Yeast (1995), 11, pp. 629-640), TEF1 (Cotrelle *et al.*, 1985, J. Biol. Chem., 260, 3090-3096) ou TDH3 (Bitter and Egan, 1984, Gene, 32, 263-274) afin de permettre son expression dans les levures transformées.

25 Le procédé de l'invention comporte en outre une étape selon laquelle les stéroïdes produits sont isolés du milieu. Une telle étape ne constitue pas un élément crucial dudit procédé et peut mettre en œuvre différentes techniques généralement utilisées dans le domaine de la purification des stéroïdes (chromatographie, HPLC, ...).

30 L'invention concerne, en outre, les nouveaux stéroïdes hydroxylés qui peuvent être obtenus par le procédé décrit précédemment ainsi que leur utilisation dans le cadre d'applications thérapeutique ou prophylactique, notamment à titre de neurostéroïdes, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal.

Elle concerne également des compositions, notamment pharmaceutiques, refermant de tels nouveaux stéroïdes hydroxylés. Ces compositions pharmaceutiques renferment en outre un ou plusieurs support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, un tel support peut renfermer tout solvant, ou liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène. Le pH de la formulation est en outre ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

Les exemples ci-après permettront de comprendre les méthodes de construction des vecteurs et de transformation des levures mais il s'agit là, pour l'essentiel, de technologies qui sont déjà connues de l'homme de métier. Les vecteurs sont décrits dans Degryse *et al.* (Yeast (1995), 11, pp. 629-640).

Il est entendu que les résultats ci dessous ne sont donnés qu'à titre d'exemples. Ainsi, les taux obtenus, par exemple dans les manipulations de bioconversion, ne sont donnés qu'à titre indicatif, et ne représentent aucunement une revendication de la capacité maximale du système en conditions optimisées.

25 EXEMPLE 1

CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION POUR L'ADNc de *cyp7b*

L'ADNc de *cyp7b* est amplifié en utilisant l'oligo (GATCGTCGACAAAAATGTCTGGAGCCACGACCCTA) en introduisant ainsi un site Sall (souligné) et une séquence de 4A avant le codon ATG et une seconde amorce (gatcacgcgttttcagcttctccaa) introduisant un site MluI après le codon stop.

Le premier produit de PCR est sous-cloné après une restriction Sall MluI dans le site Sall MluI du vecteur équivalent à pTG10164 (Degryse *et al.*, Yeast (1995), 11, pp. 629-640). Ceci conduit à un vecteur pTG14010 contenant le gène *Cyp7b* sous contrôle du promoteur CYC1 (Degryse *et al.* Yeast (1995), 11, pp. 629-640) dans un environnement 2 μ et avec le gène G418R (neo).

Ensuite, le promoteur TEF1 (Cotrelle et al., 1985, J. Biol. Chem., 260, 3090-3096) est cloné par échange ClaI Sall, ce qui conduit au vecteur pTG14011, les plasmides correspondants sont décrits dans l'article de Yeast pré-cité.

Par la méthode de recombinaison déjà décrite dans l'article de Yeast, le bloc d'expression NotI contenant le promoteur CYC1 (respectivement, TEF1) a été introduit dans le plasmide basé sur le 2 micron pTG10042 (respectivement, pTG10092) contenant le gène URA3d pour donner le plasmide pTG14012 (respectivement, pTG14014). Le plasmide pTG14015 a été construit de la même façon que pTG14014, à partir de pTG10220, qui porte le gène URA3, comme gène de sélection.

Le gène URA3d a été choisi parce qu'il conduit à une sélection pour un très grand nombre de copies en milieu minimum. Le gène URA3 produit un nombre moyen de copies, et la pression de sélection est raisonnable en milieu minimum.

Les plasmides pTG14012, pTG14014 et pTG14015 ont été introduits par transformation dans la souche FY1679-28c, les transformants sélectionnés sur un milieu minimal approprié puis stockés.

On trouvera ci-après un résumé des vecteurs d'expression pour *cyp7b* :

<u>PLASMIDE</u>	<u>PROMOTEUR</u>	<u>MARQUEUR DE SELECTION</u>
pTG14011	TEF1	G418R
pTG14012	CYC1	URA3d
pTG14014	TEF1	URA3d
pTG14015	TEF1	URA3

Tous les vecteurs contiennent le réplicon d'E. coli et l'origine de réplication du plasmide 2 μ de levure.

Les levures utilisées sont :

5 FY1679-28c (Mata *ura3-52 trp1 - 63 leu2 - 1 his3- 200 GAL fen1*), un ségréguant Mata de FY1679.

TGY202 et TGY206 sont des dérivés TRP1 obtenus après transformation des souches, respectivement, F1679-28c et TGY186.

Dans TGY156, une partie du gène *atf2* a été inactivée et remplacée par URA3. TGY186 est un dérivé de TGY156 dans lequel le gène URA3 au locus *atf2* a
10 été remplacé par TEF1 : :PGK1 sous forme de bloc d'expression.

Les souches sont transformées en utilisant la procédure à l'acétate de lithium (Ito, et al., 1983, J. Bact. 153, 163-168) ou par électroporation (Nacken et al., 1994, Nucleic Acids Res, 22, 1509-10) et sélectionnées sur un milieu solide YNBG contenant les acides aminés appropriés.

15 EXEMPLE 2

Bioconversion

Les cellules sont mises en croissance sur un milieu solide YNBG supplémenté avec les acides aminés appropriés. Une préculture est effectuée pendant
20 24 heures à 28°C dans un milieu ayant la même composition que le milieu de culture à tester. Le milieu minimal (YNB et la source de carbone) est supplémenté avec 0,5% de casamino acides (en plus des nutriments nécessaires pour la souche).

Lorsque le milieu de croissance contient du glycérol (2%), le glucose est également présent à 0,1% pour faire démarrer la culture.

Un aliquote de la préculture est utilisé pour inoculer 10 ml de milieu de
25 culture avec une densité optique à 600 nm de 0,1 et la DHEA est solubilisée dans un mélange tergitol/éthanol 50/50 à 10 mg/ml (ou ajoutée au moment indiqué). A différents intervalles de temps un aliquote de 500 μ l du milieu de culture est pris et on extrait les stéroïdes afin de les doser.

30 On ajoute au milieu de culture 4 ml de dichlorométhane, le mélange est passé au vortex pendant 10 minutes et centrifugé durant 3 minutes à 3 000

tours/minute. La phase organique est séchée sous un flux d'azote à 50°C. On ajoute au résidu 500 µl de dichlorométhane, l'échantillon est passé au vortex rapidement puis séché comme précédemment. Le résidu est repris dans un mélange isopropanol/eau 90/10 et transféré dans des tubes à injection qui sont scellés. L'échantillon est analysé
 5 par HPLC contre des standards composés de DHEA, 7-hydroxy DHEA et acétyle DHEA. Quelques standards contiennent en plus la 5-androstène-3β-17β-diol.

Les différents milieux de culture qui ont été utilisés sont YPG, YNBD (glucose à 2%) et YNBG (glycérol à 2%, glucose à 0,1%).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les exemples ci-après :

10 EXEMPLE 3

Mise en évidence d'une activité intrinsèque 17-déshydrogénase chez la levure

L'incubation de TGY202 et de l'acétyl-DHEA pendant 49 heures dans le YNBD a permis d'isoler l'acétyl-diol, indiquant une activité déshydrogénase chez la levure.

15 La caractérisation du produit obtenu a permis de déterminer que cette activité est similaire à celle de la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase des mammifères (17BDH).

EXEMPLE 4

20 Identification du gène *yil124w* codant pour l'activité 17BDH de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le gène *yil124w* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces gactgtcgacaaGTATGTCGGAGTTACAGTCACAAC et ctacacgCGTGGTGTACAA-ACTATACGGAA qui introduisent respectivement des sites de restriction SalI et MluI. Le produit de l'amplification après restriction par les enzymes SalI et MluI a été sous-
 25 cloné dans le vecteur de levure pTG10851 pour donner le vecteur pTG14491. le gène *yil124w* est ainsi sous le contrôle du promoteur de levure TEF1 et du terminateur de levure PGK1. L'origine de répllication est le 2-micron et le marqueur de sélection est le gène de résistance au G418.

Après transformation de TGY206 par pTG14491, on effectue une bioconversion pendant 24 heures dans le milieu YNBD, en utilisant la DHEA en tant que substrat. Les stéroïdes présents dans le milieu de culture sont analysés :

	DHEA	Diol
TGY206	62	13
TGY206-pTG14491	27	52

5 les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$ du stéroïde extrait du milieu de culture

Ces résultats confirment l'activité 17BDH du gène *yil124w*, et montrent que sa surexpression permet de produire des dérivés stéroïdiens réduits.

EXEMPLE 5

Génération d'un mutant Knock-Out pour le gène *yil124w*

10 Le plasmide pTG14491 a été restreint par PstI et NcoI (sites de restriction uniques dans la séquence codante de *yil124w*) et les bouts cohésifs ont été rendus francs par l'ADN polymérase de T4. Le gène URA3, est alors cloné dans ce plasmide, afin que la séquence codante de *yil124w* soit interrompue par ce marqueur de sélection URA3. Le plasmide résultant pTG14584 contient le gène URA3 dans le même sens de

15 traduction que le gène *TIL124w*. Après restriction de pTG14584 par SalI et MluI, le fragment libéré contenant *yil124w* interrompu par URA3 est introduit dans les souches TGY202 et TGY206, et les colonies recombinantes sont sélectionnées sur YNBD + LH, la sélection étant pour une prototrophie pour l'uracile. Sont ainsi obtenues respectivement les souches TGY279 et TGY282.

20 Les souches TGY206 et TGY282 sont incubées en présence de DHEA ou acétyl-DHEA dans le milieu YNBD pendant 24h et les produits obtenus sont mesurés.

Produits	DHEA	acétyl-DHEA	Diol	acétyl-diols
	Substrat DHEA			
TGY206	56	0	43	0

TGY282	86	0	0	0
	Substrat acétyl-DHEA			
TGY206	4	34	7	20
TGY282	16	46	0	0

Résultats exprimés en $\mu\text{g/ml}$ extrait du milieu de culture.

Il apparaît donc clairement que la souche TGY282 n'est plus capable de réduire le DHEA ou l'acétyle-DHEA en resp. diol ou acétyl-diols. Ceci confirme l'inactivation du gène *yil124w*, ainsi que de sa fonction 17-déshydrogénase.

- 5 Par ailleurs, il est possible d'observer que la levure possède une activité intrinsèque de désacétylation de l'acétyl-DHEA en DHEA. Ainsi, l'identification du gène responsable et sa sur-expression par rapport à l'activité APAT permettra de produire des stéroïdes sans utiliser des mutants du gène *atf2*.

EXEMPLE 6

- 10 Mise en œuvre du procédé selon la présente invention pour obtenir la 7-hydroxy-DHEA à partir de la DHEA, en utilisant la souche TGY202, transformée avec les plasmides d'expression de *cyp7b*.

- 15 La souche TGY202 transformée avec les plasmides pTG14012, pTG14014 ou pTG14015 est incubée en présence de DHEA ($40\mu\text{g/ml}$) dans un milieu YPG, pendant 48 heures, et la présence de 7-hydroxy-DHEA ($7\alpha\text{HO-DHEA}$) est évaluée dans le milieu.

Les résultats sont rassemblés au tableau ci-après :

<u>TGY202</u>	<u>7-HYDROXY DHEA</u>
pTG14012	4.2
pTG14014	6.4
pTG14015	3.1

La présence de 7 α HO-DHEA dans le milieu indique que le gène *cyp7b* est exprimé sous une forme active permettant la bioconversion de la DHEA en 7 α HO-DHEA par la levure. Ainsi, tout substrat potentiel de Cyp7b peut être hydroxylé *in vivo* par une souche de levure exprimant *cyp7b*.

- 5 Par ailleurs, ces résultats indiquent que le promoteur TEF1 est plus efficace que CYC1, et que le marqueur de sélection URA3d donne de meilleurs résultats que le marqueur URA3.

EXEMPLE 7

- 10 Augmentation de la production de 7 α HO-DHEA par bioconversion, par la modulation des conditions de fermentation

TGY202-pTG14012 et TGY202-pTG14014 sont incubées dans les milieux YNBD et YNBG pendant 48 heures, en présence de DHEA (40 μ g/ml) ajoutée au milieu immédiatement après inoculation, ou après 8 heures d'incubation.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

	DHEA (40µg/ml) ajoutée à t 0			
Milieu	YNBD		YNBG	
	TGY202- pTG14012	TGY202- pTG14014	TGY202- pTG14012	TGY202- pTG14014
acétyl-DHEA	20.1	9.6	65.2	55.8
acétyl-diol				
acétyl-triol				
DHEA	0	0	5.7	1.1
Diol	0	2.9	0	0
7αHO-DHEA	52.3	35.6	25.1	37.2
Triol	27.5	51.9	4.0	5.4
	DHEA (40µg/ml) ajoutée à t 0 + 8 heures			
acétyl-DHEA	3.0	2.0	25.1	0
acétyl-diol				
acétyl-triol				
DHEA	0	0	17.3	3.4
Diol	1.5	0	7.4	0
7αHO-DHEA	40.6	53.1	36.9	81.5
Triol	54.9	44.9	13.3	15.1

Exprimé en % de produit accumulé

On constate ainsi une influence du milieu de fermentation et du moment de l'apport du substrat DHEA pour la production sélective de 7αHO-DHEA, une

inoculation tardive donnant en général de meilleurs résultats, et le milieu YNBG étant supérieur aux autres milieux.

EXEMPLE 8

Production préférentielle de 7α HO-DHEA en l'absence de dérivés acétylés par l'utilisation de souches KO pour l'activité APAT

TGY206-pTG14014 est incubée dans du YNBD en présence de DHEA (100 μ g/ml) pendant 49 heures.

L'analyse des produits obtenus indique que l'on récupère 100% de 7α HO-DHEA (91.7 μ g/ml).

Lorsque le milieu de culture est YNBG, on obtient un mélange de 7α HO-DHEA (89%, 73.8 μ g/ml), Triol (6%, 5 μ g/ml) et DHEA (5.3%, 4.4 μ g/ml).

Ces observations indiquent qu'en l'absence d'activité APAT, on évite la production de dérivés acétylés. En revanche, la présence de l'activité intrinsèque 17BDH mène à une présence contaminante des Diol ou Triol.

EXEMPLE 9

Production préférentielle du Triol

L'incubation de TGY206-pTG14014 en présence de Diol (100 μ g/ml) pendant 48 heures mène à la production de 26.4 μ g/ml Triol (36%) des produits finaux, 74% de Diol restant) dans le YNBG. L'utilisation de YNBD donne un taux de bioconversion de 100%.

Ces résultats montrent qu'en changeant le milieu de fermentation, on peut canaliser la production de métabolites à partir d'un substrat. En particulier, on peut aisément concevoir que la surexpression du gène *yil124w* permet une accumulation rapide et/ou complète de dérivés réduits. En couplant cette surexpression avec celle de *cyp7b*, on peut ainsi aboutir à une conversion quasi-totale en Triol, à partir de DHEA comme substrat de départ.

EXEMPLE 10

Production préférentielle de l'acétyl-DHEA par l'utilisation d'une souche de levure KO pour l'activité 17BDH

Les souches TGY202 et TGY279 ont été incubées avec le DHEA pendant 24 heures dans le milieu de culture YPD, et les stéroïdes produits mesurés.

	DHEA	Ac-DHEA	Diol	Ac-Diol
TGY202	1	84	14	1
TGY279	3	96	0	1

Résultats exprimés en pourcentage du total des stéroïdes extraits du milieu de culture

Il apparaît clairement que la souche TGY279 transforme quasi totalement le DHEA en acétyl-DHEA, en l'absence de l'activité 17BDH.

10 EXEMPLE 11

Production exclusive de 7 α HO-DHEA par l'utilisation de la souche TGY282, KO pour les activités APAT et 17BDH, et exprimant *cyp7b*

Les souches TGY279 et TGY282 sont transformées avec le plasmide pTG14011 et sélectionnées sur YPG + G418. L'incubation des souches transformées dans le milieu YPD pendant 24 heures, en utilisant le DHEA en tant que substrat, permet de mesurer les taux des stéroïdes produits par ces souches.

	DHEA	Ac-DHEA	Diol	Ac-Diol	7 α HO-DHEA
TGY279-pTG14011	3	49	1	0	47
TGY282-pTG14011	31	0	1	0	68

Résultats exprimés en pourcentage du total des stéroïdes extraits du milieu de culture

Bien que la bioconversion ne soit pas allée au bout dans cette expérience, on voit que la souche TGY282-pTG14011 produit exclusivement du 7α HO-DHEA à partir du DHEA, alors qu'une souche contenant également l'activité APAT produit, non seulement du 7α HO-DHEA, mais aussi de l'acétyl-DHEA.

REVENDICATIONS

1) Procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant les étapes selon lesquelles :

- 5 • on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis
- on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion,

ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*.

10 2) Procédé selon la revendication 1 de production de stéroïde hydroxylé, caractérisé en ce lesdites levures ont une activité APAT faible ou nulle et/ou en ce que l'on cultive lesdites levures dans des conditions oxydatives.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit précurseur contient une position 7 susceptible d'être hydroxylée.

15 4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit précurseur est un stéroïde 3-hydroxylé, de préférence 3 β -hydroxylé, ou possédant une fonction 3-céto.

20 5) Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisé en ce que ledit précurseur est choisi parmi les stéroïdes à structure de type androstanique, androsténique, prégnanique, prégnénique, cholanique, cholénique, cholestérique, ergotanique, ergosténique, testostéronique ou stigmamique.

25 6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le précurseur est choisi parmi le groupe consistant en la DHEA, la testostérone, la pregnénolone, la prégnanolone, le 25-hydroxy-cholestérol, le 5- α -androstane-3 β -17 β -diol, et le 5- α -androstène-3 β -17 β -diol.

7) Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'activité APAT de la levure a été rendu faible ou nulle par inactivation du gène *atf2* ou par utilisation d'un mutant *atf2*.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la levure porte également une activité déshydrogénase.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'activité déshydrogénase est une 17-déshydrogénase qui conduit à un dérivé 17-hydroxylé.

5 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase est portée par le gène *yil124w*.

11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase de la levure a été rendue faible ou nulle, en particulier par inactivation du gène *yil124w* ou utilisation d'un mutant *yil124w*.

10 12) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la levure est du genre *Saccharomyces*.

13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le gène *Cyp7b* est sous le contrôle d'un promoteur levure choisi parmi CYC1, TEF1 et TDH3.

15 14) Stéroïde hydroxylé et/ou acétylé caractérisé en ce qu'il peut être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13.

15) Souche de levure possédant une activité 17-déshydrogénase nulle par inactivation du gène *yil124w*.

20 16) Souche de levure transformée avec un plasmide comprenant une cassette d'expression exprimant le gène *Cyp7b*.

17) Utilisation d'un stéroïde selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament pour le traitement de maladies du système nerveux central.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
DANS LES EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS